

(18)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication:

**0 237 398**  
**A1**

(12)

# DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 87400410.4

(22) Date de dépôt: 24.02.87

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: **A 61 K 37/18**

**C 07 K 3/10, C 07 K 15/04**  
**C 07 K 15/06, C 12 P 21/06**  
**A 61 K 7/48, A 61 K 9/50**

(30) Priorité: 25.02.86 FR 8602576

(43) Date de publication de la demande:  
16.09.87 Bulletin 87/38

(84) Etats contractants désignés:  
BE CH DE FR GB IT LI LU NL

(71) Demandeur: **MOET-HENNESSY RECHERCHE**  
48-50, rue de Seine B.P. 79  
F-92704 Colombes Cédex(FR)

(72) Inventeur: **Redzinski, Gérard**  
101, rue des Fauvettes  
F-45590 Saint-Cyr-en-Val(FR)

(72) Inventeur: **Meybeck, Alain**  
20 ter, rue de Bezons  
F-92400 Courbevoie(FR)

(74) Mandataire: **Warcoln, Jacques et al,**  
Cabinet Régimbeau 28, avenue Kléber  
F-75116 Paris(FR)

(54) Procédé de préparation de polypeptides biologiquement actifs, polypeptides obtenus et compositions les contenant.

(57) La présente invention concerne un procédé de préparation de polypeptides biologiquement actifs par hydrolyse de substances naturelles en milieux aqueux, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes:

- a) on prépare un homogénéisat aqueux de substances naturelles,
- b) on réalise l'hydrolyse enzymatique avec un agent d'hydrolyse comportant de l'alpha-chymotrypsine,
- c) on sépare de l'hydrolysate une fraction comportant les polypeptides de poids moléculaire déterminé et on recueille cette fraction.

Elle concerne également les polypeptides obtenus et les compositions les contenant qui sont utiles pour leurs actions sur les cellules *in vivo* et/ou *in vitro*.

EP 0 237 398 A1

PROCEDE DE PREPARATION DE POLYPEPTIDES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS,  
POLYPEPTIDES OBTENUS ET COMPOSITIONS LES CONTENANT

La présente invention concerne des polypeptides biologiquement actifs, un procédé pour leur préparation et les compositions les contenant.

Les extraits d'organes ou de tissus d'animaux ou de microorganismes sont connus depuis longtemps pour leur pouvoir de régénération de la peau et sont utilisés en cosmétologie et en pharmacie dermatologique.

Toutefois, ces extraits sont souvent préparés par des techniques conduisant à des produits difficilement reproductibles et de composition variable, en particulier lorsque ces procédés impliquent des thermodégradations comme cela est décrit, par exemple, dans le brevet français n° 2 472 385.

Ces variations dans la nature et la structure des composants des extraits ainsi préparés influent, bien entendu, sur leurs activités qui sont, elles aussi, difficilement reproductibles.

Par ailleurs, l'activité de nombreux extraits, obtenus par des procédés connus à partir d'organes ou de tissus d'animaux ou de microorganismes sur la régénération de la peau est limitée en raison de la présence dans ces extraits de quantité plus ou moins importante de substances possédant une action mitostatique, voire toxique, vis-à-vis des cellules de la peau.

Les études poursuivies par la Demanderesse lui ont permis de mettre au point la possibilité d'obtenir des polypeptides possédant des propriétés particulièrement utiles, notamment en dermatologie, en cosmétique et pour les cultures de cellules, tout en évitant des effets mitostatiques ou cytotoxiques.

En effet, la présente invention concerne des polypeptides caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par hydrolyse enzymatique de substances biologiques naturelles au moyen

de l'alpha-chymotrypsin seule ou associée à un autre enzyme protéolytique telle que la trypsine.

Pour la description de la présente invention, on entend par l'expression "substances biologiques naturelles" des macromolécules, généralement des protéines, présentes dans des organismes vivants, par exemple des organes ou tissus animaux, des fluides biologiques ou des microorganismes.

Les essais réalisés par la Demanderesse ont montré que les polypeptides obtenus par le procédé de l'invention possédaient une grande activité biologique, en particulier sur la multiplication des cellules de la peau in vitro, telles que fibroblastes, mélanocytes ou keratinocytes, leur protection contre certaines agressions telles que les rayons ultra-violet, et, in vivo, sur la restructuration de la peau et la prévention de son vieillissement actinique ou naturel.

Ces essais ont montré, en outre, que l'activité biologique de ces polypeptides était, de façon inattendue, généralement et significativement plus importante que celle des produits déjà connus et utilisés pour des applications identiques.

En outre, et de façon tout aussi inattendue des essais réalisés sur cultures de cellules de la peau par la Demanderesse ont montré que les polypeptides selon l'invention ne présentent généralement aucune cytotoxicité, ou une cytotoxicité beaucoup plus faible que celle des extraits connus d'organes, de tissus d'animaux ou de microorganismes dont il a été fait mention plus haut.

De plus, il a été mis en évidence que certains polypeptides selon l'invention correspondant à une gamme de poids moléculaire déterminée étaient plus actifs que ceux ayant des poids moléculaires inférieurs ou supérieurs.

C'est pourquoi la présente invention concerne plus particulièrement des polypeptides de poids moléculaire inférieur à 20 000 Daltons, et plus particulièrement encore des polypeptides de poids moléculaire inférieur à 10 000 Daltons.

Le procédé de préparation de ces polypeptides biologiquement actifs par hydrolyse de substances naturelles en milieux aqueux selon l'invention, est caractérisé en ce qu'il comporte les étapes principales suivantes :

a) on prépare un homogénéisat aqueux de substances naturelles,

b) on réalise l'hydrolyse enzymatique avec un agent d'hydrolyse comportant de l'alpha-chymotrypsine,

c) on recueille l'hydrolysate, et

d) on sépare de l'hydrolysate une fraction comportant les polypeptides de poids moléculaire déterminé et on recueille cette fraction.

La préparation de l'homogénéisat aqueux de substances naturelles comprend le broyage des matières premières biologiques, lorsque celles-ci sont solides.

De préférence, selon l'invention, on sépare lors de l'étape d) ci-dessus, la fraction de l'hydrolysate comportant les polypeptides de poids moléculaire inférieur à environ 20 000 Daltons, et en particulier de préférence inférieur à environ 10 000 Daltons.

En outre, on peut également selon l'invention, de l'hydrolysate ou de la fraction d'hydrolysate ci-dessus, éliminer les polypeptides de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 Daltons.

Les matières premières biologiques utilisées pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention sont d'origines variées, comme cela apparaîtra dans les exemples. Elles sont notamment d'origine animale ou issues de

microorganismes, et en particulier issues de jeunes animaux ou d'embryons. A titre d'exemples donnés uniquement à titre indicatif et nullement limitatifs, on citera plus particulièrement comme matières :

- 5 - des organes ou des tissus animaux : coeur, rate, thymus, peau, cerveau ou foie de bovins, d'ovins ou d'embryons bovins ou de poulets, placenta bovin, ovin ou humain,
- des fluides ou sécrétions biologiques : sérum de veau ou de boeuf, lait, colostrum,
- 10 - des protéines : protéines de tissus conjonctifs (collagène, élastine, réticuline, fibronectine), protéines fibreuses (fibroïne de la soie, kératine de poils ou de cheveux), séricine,
- des levures : *saccharomyces cerevisiae*.

15 Lorsque les substances naturelles mises en oeuvre sont solides, elles sont de préférence broyées avant d'être hydrolysées pour obtenir un hydrolysate aqueux. L'obtention d'un broyat peut être réalisée par des techniques connues, en particulier par broyage mécanique et/ou hydraulique des substances congelées ou non.

20 L'hydrolyse enzymatique constitue un aspect important du procédé, c'est en effet elle qui permet d'obtenir des polypeptides ayant la caractéristique structurale évoquée précédemment.

25 Pour cette hydrolyse, on utilisera comme enzyme l'alpha-chymotrypsine seule ou associée à une autre enzyme protéolytique telle que la trypsine.

Ladite association comprendra de préférence des quantités voisines d'alpha-chymotrypsine et de l'autre enzyme protéolytique.

30 Cette hydrolyse est mise en oeuvre dans le domaine d'activité optimum de la ou des enzymes, c'est-à-dire en général à une température de l'ordre de 37°C et à un pH maintenu à une valeur proche de 8, le traitement étant

effectué de préférence sous agitation douce, en général pendant 1 heure environ.

De façon générale, la quantité d'enzyme ajoutée ne constitue pas un élément caractéristique du procédé car elle peut dépendre de l'activité de la ou des enzymes utilisées, et de la nature de la substance utilisée. A titre d'exemple, dans le cas de l'utilisation d'un mélange alpha-chymotrypsine-trypsine dont l'activité enzymatique est comprise entre 1 000 et 1 500 unités BAEE/mg de solide pour la trypsine et entre 500 et 1 000 unités ATEE/mg de solide pour l'alpha-chymotrypsine, la quantité d'enzyme utilisée est de l'ordre de 1 à 4 % en poids par rapport au poids d'organe mis en oeuvre, mais plus particulièrement 1 %.

A la fin de cette étape d'hydrolyse, il importe en général d'écarter les éléments solides ou susceptibles de colmater les filtres et de gêner les opérations suivantes. C'est pourquoi, on préfère effectuer une filtration de type filtration sur filtre-presse.

De même, un chauffage modéré peut permettre d'éliminer certaines matières grasses en inactivant en outre les enzymes. Ainsi, à la fin de l'hydrolyse et avant filtration sur filtre-presse, l'hydrolysats brut peut être porté en l'espace de quelques minutes à une température de 80°C à 95°C et y est maintenu pendant 10 à 15 minutes. On laisse ensuite refroidir à température ordinaire. On procède alors comme indiqué plus haut, à la filtration sur filtre presse.

On obtient une solution dont on élimine les polypeptides et autres macromolécules de poids moléculaires supérieurs à une valeur déterminée en utilisant par exemple une membrane de filtration ayant un "seuil de coupure" de 20 000 D ou de 10 000 D ("cut off" 20 000 ou 10 000). On recueille le filtrat obtenu.

Suivant une variante du présent procédé, on soumet ledit filtrat à une filtration supplémentaire pour éliminer les peptides de faible poids moléculaire, en particulier on effectue une filtration au moyen d'une membrane à "seuil de coupure" 1 000 D et on conserve le retentat.

Bien entendu, il est possible d'utiliser d'autres procédés de séparation qui permettent de sélectionner des poids moléculaires.

Enfin, les polypeptides obtenus par le procédé selon l'invention peuvent être stérilisés, par exemple par autoclavage, par filtration stérilisante ou par tyndallisation. Les produits peuvent également être lyophilisés.

Les polypeptides selon l'invention sont utiles pour leur action sur les cellules.

C'est pourquoi, la présente invention concerne les compositions utiles pour leurs actions sur les cellules in vivo et/ou in vitro, caractérisées en ce qu'elles comportent une quantité biologiquement active de polypeptides selon l'invention ou obtenus par le procédé de l'invention et un support acceptable.

La présente invention concerne plus particulièrement les compositions cosmétiques, les compositions à usage topique externe, en particulier dermatologiques, et les compositions destinées à la mise en oeuvre de cultures cellulaires.

En effet, ces polypeptides agissent au niveau des cellules de la peau telles que fibroblastes, mélanocytes ou kératinocytes, en particulier au niveau de la stimulation du métabolisme cellulaire et de l'activation de la réplication des cellules, ce qui les rend intéressantes par exemple dans l'activation de la cicatrisation cutanée, dans la prévention du vieillissement et dans la réparation des dommages causés aux cellules, en particulier par les rayonnements ultra-violets, et en général en cosmétologie et en dermatologie

7

Les propriétés des polypeptides selon l'invention peuvent également être mises à profit dans les milieux de culture de cellules animales. Ces polypeptides favorisent la croissance des cellules et peuvent remplacer le sérum de veau en tout ou partie.

En outre, l'activité des polypeptides selon l'invention peut être renforcée en associant à d'autres composés biologiquement actifs, par exemple des vitamines telles que vitamine A, vitamine E ou leurs dérivés, des hydrolysats de protéines telles que l'élastine ou le collagène. La présente invention comprend donc aussi les compositions comportant de telles associations.

D'autre part, les polypeptides, selon l'invention ou lesdites associations peuvent être avantageusement présentés sous des formes particulières permettant d'en développer l'activité. Par exemple, on peut encapsuler ces polypeptides ou associations dans des liposomes. On obtient ainsi des compositions qui sont de façon inattendue significativement plus actives que lesdits polypeptides ou associations à l'état libre.

Les supports sont en particulier des supports cosmétiques ou pharmaceutiques connus de l'homme de métier.

Par exemple, on peut préparer des crèmes oxygénantes pour la peau, des crèmes cicatrisantes, des crèmes régénérantes, des lotions de traitement capillaire des crèmes anti-rides, des lotions après-rasage, des produits solaires, des laits après-soleil réparateurs et des crèmes anti-érythèmes ou des laits et crèmes pour le corps. Bien entendu, les compositions selon la présente invention peuvent comporter d'autres principes actifs ayant une activité de même type ou une activité complémentaire.

Les exemples ci-après, donnés seulement à titre indicatif sans être pour autant limitatifs, permettent de faire mieux comprendre les caractéristiques et avantages de la présente invention.



EXEMPLE 1 :

Peptides de thymus de veau (référence Ex 1) obtenus après hydrolyse par l'alpha-chymotrypsine

5 On hache et broie le plus finement possible, en présence de 4 litres d'eau déminéralisée, 1 kilogramme de thymus de veau fraîchement prélevés dans des conditions aseptiques.

10 Le tout est homogénéisé après l'addition de 0,6 grammes de chlorure de calcium. Le pH de la suspension obtenue est ajusté à 8 par une solution de soude à 40 %, et on chauffe pour amener la température à 37°C environ. On ajoute alors 0,2 litres d'une solution aqueuse à 5 % en poids d'alpha-chymotrypsine pour provoquer l'hydrolyse des protéines.

15 L'hydrolyse est poursuivie pendant 3 heures en maintenant la température à 37°C et le pH à 8 sous agitation douce, puis on chauffe à 80°C pendant 15 minutes. On laisse refroidir à température ordinaire (23°C environ).

20 La suspension obtenue est d'abord filtrée sur filtre-pressé, puis le filtrat est ultra-filtré sur membrane "cut off" 10 000. L'ultra-filtrat est stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes. Cette stérilisation n'est pas nécessaire si on a opéré précédemment dans des conditions stériles.

25 La quantité d'extrait sec dans la solution de peptides obtenue est de 30 g/litre.

EXEMPLE 2 :

Peptides de thymus de veau (référence Ex 2), obtenus après hydrolyse par un mélange alpha-chymotrypsine-trypsin

30 On opère comme dans l'exemple 1, à partir d'un kilogramme de thymus de veau, avec comme agent d'hydrolyse

0,2 litres de solution aqueuse à 5 % en poids d'un mélange contenant des quantités voisines d'alpha-chymotrypsine et de trypsine.

5 La solution finale de peptides a une teneur en extrait sec de 40 g/litre.

EXEMPLE 3 :

Peptides de coeur de boeuf (référence Ex 3) obtenus après hydrolyse par un mélange alpha-chymotrypsine-trypsine

10 On opère comme dans l'exemple 2, à partir d'un kilogramme de coeur de boeuf fraîchement prélevé dans des conditions aseptiques, en utilisant le même mélange d'enzymes.

La solution finale de peptides a une teneur en extrait sec de 60 g/litre.

EXEMPLE 4 :

15 Peptides de tissu placentaire humain (référence Ex 4) obtenus après hydrolyse par l'alpha-chymotrypsine

On opère comme dans l'exemple 1, à partir d'un kg de placenta humain fraîchement recueilli et débarrassé totalement du sang.

20 La solution finale de peptides a une teneur en extrait sec de 40 g/litre.

EXEMPLES 5 et 6 :

25 Peptides de tissu placentaire humain (référence Ex 5 et Ex 6) obtenus après hydrolyse par un mélange alpha-chymotrypsine-trypsine

30 On opère comme dans l'exemple 2, à partir d'un kg de placenta humain fraîchement recueilli et débarrassé totalement du sang, on obtient une solution de peptides de poids moléculaire ne dépassant pas 10 000 Daltons, que l'on stérilise à l'autoclave (référence Ex 5).

Sur une partie de la solution ci-dessus, on effectue une ultra-filtration supplémentaire sur membrane "cut off" 1 000. L'ultra-filtrat est éliminé. Le rétentat obtenu, qui sera stérilisé, est une solution de peptides dont les poids moléculaires sont compris entre 1 000 et 10 000 (référence Ex 6).

Le poids d'extrait sec de la solution de peptides avant la dernière ultra-filtration (solution Ex 5) est de 40 grammes par litre, celui du rétentat après cette ultra-filtration (solution Ex 6) est de 30 grammes/litre.

#### EXEMPLE 7 :

Peptides de sérum de boeuf (référence Ex 7) obtenus après hydrolyse par l'alpha-chymotrypsine

On opère comme dans l'exemple 1 avec 5 litres de sérum de boeuf prélevé dans des conditions aseptiques dont on ajuste le pH à 8 par une solution de soude à 40 %.

La solution finale de peptides a une teneur en extrait sec de 60 grammes par litre.

#### EXEMPLES 8 à 10

Peptides de sérum de boeuf (références Ex 8, Ex 9, Ex 10) obtenus après hydrolyse par un mélange alpha-chymotrypsine trypsine

On opère comme à l'exemple 7, à partir de 5 litres de sérum de boeuf, prélevés dans des conditions aseptiques avec comme agent d'hydrolyse 0,2 litres d'une solution aqueuse enzymatique identique à celle employée dans l'exemple 2. On obtient une solution de peptides de poids moléculaire ne dépassant pas 10 000 Daltons que l'on stérilise à l'autoclave (référence Ex 8).

Une partie de la solution ci-dessus subit une ultra-filtration supplémentaire sur membrane "cut off" 1 000. L'ultra-filtrat et le rétentat sont stérilisés à 1'autoclave. Le premier contient des peptides de poids moléculaire inférieur à 1 000 (référence Ex 9), le second des peptides de p. m. compris entre 1 000 et 10 000 (référence Ex 10).

Les extraits secs pour les solutions obtenues sont respectivement :

- 10           - solution Ex 8 : 50 g/litre,
- solution Ex 9 : 10 g/litre,
- solution Ex 10 : 40 g/litre.

EXEMPLE 11 :

Peptides de Saccharomyces cerevisiae (référence Ex 11),  
15 obtenus après hydrolyse par un mélange alpha-chymotrypsine-  
trypsine

Les levures contenues dans 50 ml d'une suspension aqueuse concentrée par centrifugation, sont broyées au moyen d'un homogénéiseur hydraulique en présence de 500 ml d'une solution tampon à pH 7,5. Ce broyat est porté à 37°C, et  
20 on effectue alors une hydrolyse enzymatique par addition de 20 ml de la solution aqueuse d'enzymes utilisée à l'exemple 2. La température est maintenue à cette valeur pendant une heure. A la fin de l'hydrolyse, le mélange est  
25 ultra-filtré sur membranes "cut off" 10.000.

L'extrait sec de la solution finale de polypeptides est de 30 grammes par litre.

EXEMPLES 12 et 13 :

Peptides de thymus de veau ou de sérum de boeufs encapsulés  
30 dans des liposomes (respectivement ref Ex 12 et Ex 13)

La préparation de liposomes est effectuée selon le procédé décrit dans le brevet français n° 2 521 565.

On dissout 90 grammes de lécithine et 10 grammes de cholestérol dans 1 litre de dichlorométhane. La solution

obtenue et atomisée dans un courant d'air chaud à 60°C. On obtient 100 grammes d'une poudre lipidique qui est dispersée par agitation mécanique dans 2 litres d'une solution aqueuse contenant 0,15 % d'extrait sec de peptides de thymus de veau obtenus selon l'exemple 2 ou de peptides de sérum de boeuf obtenus selon l'exemple 7. On obtient une suspension de liposomes dont on améliore la stabilité par le procédé décrit dans la demande de brevet français n° 2 534 487, consistant essentiellement à homogénéiser ladite suspension de liposomes dans un homogénéiseur sous pression pendant 15 minutes à 300 bars et à un débit de 50 litres par heure.

On obtient ainsi une suspension homogène de liposomes contenant les peptides de thymus de veau (Ex. 12), ou les peptides de sérum de boeuf (Ex. 13). La taille moyenne de ces liposomes est de 100 nanomètres.

#### EXEMPLE 14 :

Composition contenant des peptides de coeur de boeuf et des hydrolysats d'élastine et de collagène (ref. Ex 14)

On prépare une solution aqueuse dont la composition est la suivante :

- peptides de coeur de boeuf en solution aqueuse à 3 % en poids d'extrait sec (Ex 3) selon l'exemple 3.... 33 ml
- hydrolysats d'élastine ..... 1 g
- hydrolysats de collagène ..... 1 g
- Eau distillée qsp ..... 100 ml

#### EXEMPLE 15 :

Activité des peptides selon l'invention sur la multiplication de fibroblastes en culture

Des tests ont été réalisés sur des cultures de fibroblastes dans un milieu M.E.M. (milieu minimum de Eagle - GIBCO®), en présence ou non de peptides selon l'invention, pour mesurer l'activité multiplicatrice de ces peptides.

Les peptides et compositions de peptides selon l'invention ont été testées. En outre, à titre comparatif, les peptides suivants ont également été testés :

5 - peptides de sérum de boeuf (référence SBT) obtenus après hydrolyse par la trypsine seule selon le procédé décrit à l'exemple 7 ci-dessus dans lequel on a remplacé l'alpha-chymotrypsine par une quantité de trypsine présentant la même activité enzymatique exprimée en unités BAEE/mg de solide. Extrait sec : 30 mg/ml ;

10 - peptides de thymus du commerce (référence TPP) préparés par extraction aqueuse d'un broyat de thymus, suivie de l'élimination des substances de haut poids moléculaire .

Le tableau 1 présente les résultats de ces tests.

15 Les extraits ont été évalués comme très actifs (xxx), actifs (xx), ou moyennement actifs (x).

Par rapport à un extrait du commerce de même origine, les extraits selon l'invention sont plus actifs (Ex1 et TPP) .

20 L'ajout d'alpha-chymotrypsine au système enzymatique permet d'augmenter l'activité (Ex 8-SRT) .

L'élimination des polypeptides de faible poids moléculaire ( < 1000 D ) permet d'augmenter l'activité des extraits (Ex 5-Ex 6) .

25 On remarque que l'association de peptides selon l'invention, tels que ceux de coeur de boeuf avec des hydrolysats d'élastine et de collagène, améliore encore l'activité (Ex 14, Ex 3) .

Il apparaît donc clairement que les peptides selon l'invention favorisent la régénération cellulaire.

TABLEAU 1

<u>REFERENCE</u>	<u>ORIGINE DES PEPTIDES</u>	<u>SYSTEME</u> <sup>(1)</sup> <u>ENZYMATIQUE</u>	<u>POIDS MOLECULAIRE</u> <u>(PM)</u>	<u>ACTIVITE</u>
Ex 1	Thymus de veau	A	< 10 000	xxx
Ex 3	Coeur de boeuf	B	< 10 000	x
Ex 4	Placenta humain	A	< 10 000	xxx
Ex 5	Placenta humain	B	< 10 000	xx
Ex 6	Placenta humain	B	$10^3 < PM < 10^4$	xxx
Ex 8	Sérum de boeuf	B	< 10 000	xx
Ex 11	Saccharomyces Cerevisiae	B	< 10 000	x
Ex 14	Coeur de boeuf + élastine + collagène	B	< 10 000	xxx
SBT	Sérum de boeuf	C	< 10 000	x
TPP	Extrait de thymus de veau du com- merce			x

(1) hydrolyse enzymatique effectuée avec :

A = alpha-chymotrypsine seule

B = mélange équiactif d'alpha-chymotrypsine et de trypsine

C = trypsine seule

EXEMPLE 16 :Protocole des tests de l'exemple 15

On réalise dans trois groupes numérotés de 1 à 3, de trois boîtes de Pétri des cultures de fibroblastes sous-cutanés de souris, dans 2 millilitres d'un milieu M.E.M. (Milieu Minimum de Eagle) GIBCO<sup>®</sup> additionné de 100 microgrammes par millilitre de streptomycine et 100 UI par millilitre de pénicilline. Le nombre de cellules à l'ensemencement est de 50 000 cellules par millilitre.

Dans les boîtes n° 1 et n° 2 on ajoute 5 % en poids de sérum de veau total et dans les boîtes n° 3, on ajoute 2,5 % en poids de sérum de veau total.

Puis on remplace dans les boîtes n° 1 les 2 millilitres de milieu (contenant les 5 % de sérum de veau) par la même quantité de milieu frais MEM additionné de 2,5 % en poids de sérum de veau total et de 1 % en poids d'une solution de peptides à tester.

Dans les boîtes 2 et 3, boîtes témoin, on remplace également les 2 millilitres de milieu par la même quantité de milieu frais MEM additionné respectivement de 5 % et de 2,5 % en poids de sérum de veau total.

Pour tout ces tests, la concentration en polypeptides est d'environ 0,2 g/l.

Toutes les boîtes sont alors placées dans des conditions optimales de culture (37°C ; 5 % en CO<sub>2</sub> ; 98 % d'humidité relative).

Après trois jours, on traite les cultures à la trypsine pour décoller les cellules et on dénombre les cellules dans chaque boîte pour évaluer l'activité.



EXEMPLE 17 :Activité des peptides selon l'invention sur la réparation de fibroblastes irradiées par des rayons ultra-violets

Le test est effectué sur une durée de cinq jours.

5 Le premier jour, on ensemence avec 70 000 fibroblastes sous-cutanés de souris trois groupes de trois boîtes de Petri, numérotés de 1 à 3, contenant du milieu M.E.M. (GIBCO<sup>®</sup>) additionné de 2,5 % en poids de sérum de veau. Les boîtes n° 3 contiennent, en outre, 1 % en poids de la solution aqueuse  
10 des peptides à tester.

Les boîtes n° 1 et n° 2 sont des boîtes témoin.

Les trois groupes de boîtes sont ensuite placés pendant 24 heures à l'étuve à 37 °C sous atmosphère de gaz carbonique.

15 Le deuxième jour, on rince les boîtes par une solution tampon au phosphate monosodique à 1,8 %, ne contenant ni calcium ni magnésium, puis on expose les boîtes n° 2 et 3 en présence de la solution PBS, à un rayonnement ultra-violet UV de 300 nanomètres de longueur  
20 d'onde, et de 0,1 milli-Watt/cm<sup>2</sup> d'énergie.

La durée d'exposition est de 75 secondes qui, pour les boîtes témoin n° 2 correspond dans ces conditions à la mort de 50 % des cellules. Après cette irradiation, la solution saline est remplacée par du milieu de culture  
25 M.E.M. additionné de 2,5 % de sérum de veau, la boîte n° 3 contient, comme la veille la même quantité (1 %) de solution de peptides à tester. On remplace également dans les boîtes témoin n° 1, qui n'ont pas été irradiées, la solution de rinçage par du milieu M.E.M. additionné de 2,5 % de  
30 sérum de veau. Les trois groupes de boîtes sont à nouveau placés à l'étuve à 37 °C, sous atmosphère de gaz carbonique pendant 72 heures.

A l'issue de cette période, le milieu de culture est éliminé. On traite les cultures à la trypsine pour  
35 décoller les cellules et on effectue une numération dans

chaque boîte. Les activités ont été aussi évaluées : très actif (xxx), actif (xx), moyennement actif (x), non actif (-).

Les résultats sont rapportés au tableau 2 ci-après.

D'après ces résultats, il apparaît donc clairement que les peptides selon l'invention favorisent la réparation des effets néfastes des UV.

. L'emploi d'alpha-chymotrypsine pour la préparation des peptides est bénéfique (comparaison avec SBT).

. L'élimination des polypeptides de faible poids moléculaire (< 1 000 D) permet d'augmenter l'activité des extraits.

TABEAU 2

<u>Référence</u>	<u>Origine des peptides</u>	<u>Enzyme</u> <sup>(1)</sup>	<u>PM</u> <u>Dalton</u>	<u>Concen-</u> <u>tration C</u> <u>g/l</u>	<u>Activité</u>
Ex 2	thymus de veau	B	$< 10^4$	0,4	xx
Ex 3	cœur de boeuf	B	"	0,6	x
Ex 7	sérum de boeuf	A	"	0,6	x
Ex 8	sérum de boeuf	B	"	0,5	xx
Ex 10	sérum de boeuf	B	$10^3$ à $10^4$	0,4	xxx
EX 14	cœur de boeuf + élastine + collagène	B	$< 10^4$	0,1	xxx
SBT	sérum de boeuf	C	"	0,3	-

(1) hydrolyse enzymatique effectuée avec :

A = alpha-chymotrypsine seule

B = mélange équiacif d'alpha-chymotrypsine et de trypsine

C = trypsine seule

0237398

EXEMPLE 18Gel cicatrisant% en  
poids

- |   |  |       |
|---|--|-------|
| 5 | . Solution aqueuse de peptides de sérum<br>de boeuf, selon l'exemple 8 | 10 %  |
|   | . Excipient pour gel de CARBOPOL <sup>®</sup> , qsp                    | 100 % |

EXEMPLE 19Crème de soins% en  
poids

- |    |  |       |
|----|--|-------|
| 10 | . Suspension aqueuse de liposomes<br>encapsulant des peptides de thymus de<br>veau, selon l'exemple 12 | 25 %  |
|    | . Excipient émulsionné huile dans eau, qsp   | 100 % |

15                    La crème obtenue, utilisée à raison d'une  
application quotidienne, améliore l'état de surface de  
la peau.

EXEMPLE 20Gel régénérant% en  
poids

- |    |   |       |
|----|---|-------|
| 20 | . Suspension aqueuse de liposomes<br>encapsulant une composition à base de<br>peptides de coeur de boeuf, selon<br>l'exemple 14 | 20 %  |
|    | . Excipient pour gel de CARBOPOL <sup>®</sup> , qsp   | 100 % |

25                    Le gel obtenu est particulièrement avantageux  
pour régénérer les peaux prématurément vieilles par les  
rayons ultra-violets.

EXEMPLE 21Lait pour le corps% en  
poids

- . Solution aqueuse de peptides de  
Saccharomyces cerevisiae, selon l'exemple 11 10 %
- . Excipient, qsp 100 %

EXEMPLE 22Crème de nuit% en  
poids

- . Solution aqueuse de peptides de tissu  
placentaire, selon l'exemple 4 5 %
- . Excipient émulsionné eau dans l'huile, qsp 100 %

EXEMPLE 23Composition pour milieux de culture cellulaire% en  
poids

- . Solution aqueuse d'une composition à base  
de peptides de coeur de boeuf, selon  
l'exemple 14 5 %
- . Milieu M.E.M.<sup>®</sup> (Minimum Eagle Medium) 95 %

Cette composition peut être avantageusement utilisée  
pour la culture de fibroblastes.

EXEMPLE 24Lait bronzant% en  
poids

- . Solution aqueuse de peptides de coeur  
selon l'exemple 3 10 %
- . Acétate de vitamine E 1 %
- . Excipient émulsionné huile dans eau, qsp 100 %

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de polypeptides biologiquement actifs par hydrolyse de substances naturelles en milieux aqueux, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 5 a) on prépare un homogénéisat aqueux de substances naturelles,  
b) on réalise l'hydrolyse enzymatique avec un agent d'hydrolyse comportant de l' $\alpha$ -chymotrypsine,  
c) on recueille l'hydrolysate, et  
10 d) on sépare de l'hydrolysate une fraction comportant les polypeptides de poids moléculaire déterminé et on recueille cette fraction.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à l'étape d), on sépare la fraction comportant les polypeptides de poids moléculaire inférieur à environ 20 000 Daltons.

- 15 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'à l'étape d), on sépare la fraction comportant les polypeptides de poids moléculaire inférieur à environ 10 000 Daltons.

- 20 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape d), on sépare de l'hydrolysate ou de la fraction d'hydrolysate comportant les polypeptides de poids moléculaire inférieur à une valeur déterminée, la fraction comportant les polypeptides de poids moléculaire supérieur à environ 1 000 Daltons.

- 25 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'en outre, avant de séparer de l'hydrolysate une fraction comportant les polypeptides de poids moléculaire déterminé, on effectue une filtration pour éliminer les particules et agglomérats solides.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'agent d'hydrolyse est constitué seulement par l'alpha-chymotrypsine.

5 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'agent d'hydrolyse est constitué d'alpha-chymotrypsine et d'une autre enzyme protéolytique.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'agent d'hydrolyse est constitué d'alpha-chymotrypsine et de trypsine.

10 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les substances naturelles sont issues de matières biologiques d'origine animale ou de microorganismes.

15 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'homogénéisat de substances naturelles est préparé à partir de matières premières choisies parmi :

20 - des organes ou des tissus animaux tels que :  
coeur, rate, thymus, peau, cerveau ou foie de bovins ou d'ovins ou d'embryon bovin ou de poulets, les placentas  
bovins, ovins ou humains,

- ou des fluides ou sécrétions biologiques tels que le sérum de veau ou de boeuf, le lait, le colostrum,

25 - ou des protéines telles que les protéines de  
tissus conjonctifs comme le collagène, l'élastine, la réticuline, ou la fibronectine, les protéines fibreuses comme les  
fibroïnes de la soie, la kératine des poils ou des cheveux,  
ou la séricine,

- ou des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*.

30 11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'homogénéisat de substances naturelles est préparé à partir de thymus de veau, de sérum de boeuf, de coeur de boeuf ou de placenta humain.

35 12. Polypeptides biologiquement actifs obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 11.

13. Polypeptides biologiquement actifs selon la revendication 12, caractérisés en ce qu'ils proviennent de thymus de veau, de sérum de boeuf, de coeur de boeuf ou de placenta humain.

5 14. Polypeptides selon la revendication 12, caractérisés en ce qu'ils proviennent de sérum de boeuf, ou de placenta humain et en ce qu'ils ont un poids moléculaire compris entre 20 000 Daltons et 1 000 Daltons, de préférence entre 10 000 Daltons et 1 000 Daltons.

10 15. Compositions utiles pour leurs actions sur les cellules in vivo et/ou in vitro, caractérisées en ce qu'elles comportent une quantité biologiquement active de polypeptides selon l'une des revendications 12 à 14 ou obtenu par procédé selon l'une des revendications 1 à 11, et un support acceptable.

15 16. Compositions cosmétiques selon la revendication 15.

17. Compositions à usage topique externe selon la revendication 15.

20 18. Compositions destinées à la mise en oeuvre de cultures cellulaires selon la revendication 15.

19. Compositions selon l'une des revendications 15 à 18 caractérisées en ce qu'elles comportent en outre du sérum de veau.

20) Compositions selon l'une des revendications 15 à 19, caractérisées en ce qu'elles comportent, en outre, une vitamine ou l'un de ses dérivés tels que l'acétate de vitamine E.

21. Compositions selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisées en ce qu'elles comportent en outre un hydrolysate de protéines, notamment un hydrolysate d'élastine et/ou de collagène.



22. Compositions selon l'une des revendications 15 à 21, caractérisées en ce que les polypeptides sont inclus dans des liposomes.

5 23. Compositions selon la revendication 22, caractérisées en ce que les polypeptides sont préparées à partir de thymus de veau.



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
X	EP-A-O 049 666 (INSERM) * Revendications 1,2,4,9,10,13 *	1,3,4, 6-8,10	A 61 K 37/18 C 07 K 3/10 C 07 K 15/04 C 07 K 15/06 C 12 P 21/06
Y	---	15,17	A 61 K 7/48 A 61 K 9/50
Y	US-A-3 558 770 (A.L. GORDON) * Revendications 1,4 *	15,17	
X	FR-A-2 321 849 (CARL FREUDENBERG) * Revendications 1-3 *	1,3,4, 6-10, 15,21	
X	EP-A-O 169 115 (RHONE-POULENC SANTE) * Revendications 1,2,4-6; page 7, ligne 27 *	1,3,4, 6-18, 22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)  A 61 K C 07 K
X	EP-A-O 170 550 (RHONE-POULENC SANTE) * Revendications 1,2,4,5,9; page 10, ligne 1 *	1,4,6- 10,15- 17,22	
A	EP-A-O 101 063 (HOECHST AG) * Page 12, lignes 5-11,19-23 *	1,3,6- 8,10- 14,23	
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 09-06-1987	Examineur RYCKEBOSCH A.O.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons  & : membre de la même famille, document correspondant	